

PREPARATION OF LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE AND LYSOPHOSPHATIDYLETHANOLAMINE CONTAINING LINOLIC ACID AS ONLY CONSTITUTING FATTY ACID

Patent Number: JP5003791
Publication date: 1993-01-14
Inventor(s): TSUCHIDA TOSHIO; others: 07
Applicant(s):: MERCIAN CORP
Requested Patent: ☐ JP5003791
Application Number: JP19910180137 19910625
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P13/00 ; C12P13/02
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE:To advantageously produce on an industrial scale, the subject compounds having physiologically active actions such as a hemolytic action and useful as synthetic intermediates for platelet-activating factors by culturing a bacterium strain belonging to the genus *Phoma* in a nutrient medium and subsequently collecting the compounds from the produced bacterium cells.

CONSTITUTION:A bacterium strain [e.g. *Phoma.humicola* Mer-WF 8035 (FERM P-12311)] belonging to the genus *Phoma* is inoculated on a seed medium placed in an Erlenmeyer flask, cultured with shaking at 28 deg.C for 3 days. The obtained seed culture solution is inoculated on a medium in a jar fermenter and cultured at 28 deg.C for 88hrs with air-bubbling. The culture solution is filtered to collect the solid content of bacterium cells, which are mixed with methanol at room temperature with stirring for extracting lipids. The methanol is distilled off under vacuum to concentrate the extract solution, and the concentrated residus are extracted with butanol to provide lysophosphatidylcholine and/or lysophosphatidylethanolamine which contain linolic acid as an only constituting fatty acid.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-3791

(43) 公開日 平成5年(1993)1月14日

| | | | | |
|---------------------------|------|---------|----|--------|
| (51) Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | FI | 技術表示箇所 |
| C 1 2 P 13/00 | | 6977-4B | | |
| | | 13/02 | | |
| // (C 1 2 P 13/00 | | 6977-4B | | |
| C 1 2 R 1:645) | | | | |
| (C 1 2 P 13/02 | | | | |

審査請求 未請求 請求項の数2(全4頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-----------|-----------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願平3-180137 | (71) 出願人 | 000001915 メルシヤン株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号 |
| (22) 出願日 | 平成3年(1991)6月25日 | (72) 発明者 | 土田 外志夫 神奈川県相模原市矢部2-3-24 ハーモ ニー矢部201号 |
| | | (72) 発明者 | 金戸 玲 神奈川県横浜市瀬谷区相沢5-65-1 C 202 |
| | | (72) 発明者 | 柴本 憲夫 神奈川県茅ヶ崎市松ヶ丘2-2-52-202 |
| | | (74) 代理人 | 弁理士 塩澤 寿夫 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンの製造方法

(57) 【要約】

【目的】 溶血作用等の種々の生理活性作用を有し、血小板活性化因子の合成需要中間体にもなりえるリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンを微生物を用いて製造する方法を提供する。

【構成】 ホーマ属に属する菌体、例えばホーマ・フミコラ Mer-WF8035 (FERM P-1231) を栄養培地で培養し、得られた菌体からリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及び／又はリゾホスファチジルエタノールアミンを単離精製する、リノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及び／又はホスファチジルエタノールアミンの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ホーマ属に属する菌株を栄養培地で培養し、得られた菌体からリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリンを採取することを特徴とするリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリンの製造方法。

【請求項2】 ホーマ属に属する菌株を栄養培地で培養し、得られた菌体からリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルエタノールアミンを採取することを特徴とするリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリ

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ホーマ属に属する菌株によるリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンの製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】複合脂質であるリン脂質は、成分としてホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸等、又、微量成分としてリゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルコリンが知られている。しかし、これら種々のリン脂質は、相互に分離することが難しく、従って、それぞれ単独で使用されることは非常に少ない。

【0003】しかし、リン脂質は、リボソームを構成する際に有用であること、又、生体膜上などで多くの生理的役割を果たしていることから、医薬品としての使用が期待されている。

【0004】一方、リノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンは、強い溶血作用、種々の酵素の活性化及び不活性化等の生理活性作用、又、天然の界面活性剤としての利用が知られている。〔細胞融合誘導能；A.R. Pool et al, Nature(London), 227, 810(1970)、酵素の活性化；A.Martonosi et al, J.Biol.Chem., 243, 61(1968)、天然の界面活性剤；H.Komai et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 53, 82(1973)〕

【0005】現在、リゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンの製造には、ホスファチジルコリンに蛇毒ホスホリパーゼを作用させる酵素的加水分解法が知られている〔生化学実験講座 3 (脂質の化学)、日本生化学会編(井上圭三)、東京化学同人(1974)〕。しかし、この製法では、リゾホスファチジルコリン等は種々の構成脂肪酸の混合物として得られる。リノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンの製造方法としては、1, 2-イソプロピリデングリセリンを出発原料とする合成法(合成が煩雑なグリセリ

ルホスホリルコリンを出発原料とする合成方法)のみが報告されている。この合成法は、多工程を要するものである〔特開平1-311088号公報参照〕。

【0006】これまでのところ、微生物を用いてリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンを製造する方法は、知られていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、リノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンを効率的に製造できる新規な方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、同化しうる炭素、窒素、及び無機塩類供給源を含む培地で、リノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンを生成する微生物の検索を行った。その結果、ホーマ属の微生物が、リノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンを生成することを発見し、本発明を完成するに至った。

【0009】本発明は、同化しうる炭素、窒素、及び無機塩類供給源を含む培地で、ホーマ属に属する菌株を液中で好氣的に培養することにより得られた菌体から、リノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及び／又はリゾホスファチジルエタノールアミンを採取することを特徴とするリゾホスファチジルコリン及び／又はリゾホスファチジルエタノールアミンの製造方法に関するものである。

【0010】本発明のリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンを生産する微生物は、ホーマ属に属する微生物である。その一例として本発明者らが土壌から新たに分離したホーマ・フミコラMer-WF8035がある。ホーマ・フミコラMer-WF8035は以下の菌学的性質を有する。

【0011】1. 各種培地における生育形態

培養はすべて、26℃で実施し、寒天平板培地上での生育形態を観察した。

(1) ツァベック寒天培地

生育は大変速く、26℃、7日間の培養でコロニーの直径は、82mmである。コロニーは、放射状で2種類の形態を示し、綿毛状に気中菌糸の良く生育した部分(20-80%を占める)と、気中菌糸は少なく、柄子殻(Pyrenidium)を多く形成する部分とに分かれる。コロニー表面の色は気中菌糸の多い部分では薄黄色であり、柄子殻形成部分では暗い黄茶色である。厚膜胞子(Clamydospore)、有性生殖器官の形成はない。

【0012】(2) オートミール寒天培地

生育は大変速く、26℃、7日間の培養で、コロニーの

3

直径は、85mmである。コロニーはツアベック寒天培地と同様で、綿毛状に気中菌糸を形成する部分と柄子殻を多数着性して気中菌糸の少ない部分(70-80%を占める)の2種類のコロニーが放射状に生育する形態を示し、柄子殻を多数形成している。気中菌糸のコロニー表面は明るい茶灰色であり、柄子殻形成コロニーの表面は暗い黄茶色を呈する。厚膜胞子の形成や有性生殖器官の形成はない。

【0013】2. 形態的性状

オートミール寒天培地上で、多数の暗い茶色をした柄子殻を培地中あるいは培地の表面近くに形成する柄子殻は上部に乳首状突起を持った球形-半球形で、直径50-150μmの大きさである。分生子(Conidia)は柄子殻の内壁に着生する分生子柄(Conidiophore)から多数形成され、柄子殻の中に充満し、熟成すると乳首状突起部が破れて、多数の分生子を噴出する。分生子は1細胞性の表面が平滑な楕円形であり、大きさは5.0-11.0μm × 3.5-4.5 μmである。

【0014】以上の形態的性状から、柄子殻を形成し有性生殖器官がないことから、不完全菌類(Fungi Imperfecti)に属する菌であり、柄子殻を形成することからスフェロプシド目(Sphaeropsidales)に属する菌であった。柄子殻の形態、分生子の大きさなどからホーマ属(Phoma)の菌であり、ジェー、シー、ギルマン(J.C. Gilman)の「ア・マニユアル・オブ・ソイル・ファンジ」(A Manual of soil Fungi; 1957)を参考に既知菌種を検索したところ、ホーマ・フミコラ(Phoma humicola)の性状と一致した。従って、本菌をホーマ・フミコラMer-WF8035(Phoma humicola Mer-WF8035)と同定し、工業技術院、微生物工業技術研究所にFERM P-12311として寄託した。

【0015】本発明の製造方法には、上記菌株に限らず、ホーマ属に属するリゾホスファチジルコリン及び/又はリゾホスファチジルエタノールアミンを生産する能力を有する菌株のいずれを用いることもできる。

【0016】培養法は原則的には糸状菌(カビ)の培養法に準ずるが、通常は液体培養による深部培養法が最適である。培養に用いられる培地としては当該菌が利用できる栄養源を含む培地であれば良い。栄養源としては従来からカビの培養に利用されている公知のものが使用できる。例えば炭素源としてグルコース、ガラクトース、マルトース、デキストリン、澱粉、水飴、大豆油、など単独または組合せて用いることができる。無機及び有機窒素源としては、塩化アンモニウム、尿素、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ソーダ、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーンステープリカー、大豆絞りかす、オートミール、カザミノ酸、バクトソイトンなど単独及び組合せて用いることができる。その他必要に応じて、食塩、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸塩、などの無機塩を加えることができ

4

る。また本菌の生育や目的生成物であるリゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミンの生産を促進する有機物質、たとえばビタミン類、アミノ酸類、及び微量金属塩を加えることができる。また必要に応じてアデカノール(旭電化工業)、やシリコンなどの消泡剤を添加できる。

【0017】培養温度は20-35℃とし、培地のpHは中性~やや酸性付近とすることが望ましい。液体培養では通常3-5日間培養を行うと、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミンが菌体中に蓄積される。但し、上記培養条件は、使用する微生物の種類や特性、外部条件等に応じて適宜変更できる。培養菌体中の生成量が最大に達した時、培養を止め、菌体を濾過し、次いで菌体中より、目的物質を精製分離する。

【0018】目的生成物であるリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンの採取は、上記リゾホスファチジルコリン等を公知の分離手段、例えば抽出法により菌体から分離し、さらに公知の精製法により単離精製することにより行われる。抽出法は、アルコールを用いて行うことが好ましい。アルコール溶媒としては、通常、メタノール、エタノール、プロパノール等の低級アルコールが用いられるが、メタノールもしくはエタノールの使用が望ましい。抽出処理は、培養液より濾過法あるいは、遠心分離法によって得られた湿潤した菌体に、アルコールを重量比で5-15の割合で、好ましくは9-12の割合で加え、室温で攪拌機を用いて攪拌することにより効果的に行うことができる。抽出時間は2-4時間とすることが適当である。こうして得られた菌体からのアルコール抽出液は、濾過法あるいは遠心分離法により菌体固形分から分離される。

【0019】このアルコール抽出液は、濃縮後、アルコールを除いた水溶液についてn-ブタノール抽出などを行い、目的とする脂質を有機溶媒層に抽出する。次いで抽出液を更に、例えばシリカゲルカラム、セファデックスLH-20カラム(ファルマシア社製)を用いたクロマトグラフィーなどに付して、リゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンをそれぞれ単離精製する。吸着樹脂、活性炭素による吸着法、イオン交換樹脂による方法、セファデックス、バイオゲルなどによる分子ふるいカラム法、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーなどの方法を適宜組合せて用いることもできる。

【0020】尚、目的生成物であるリゾホスファチジルコリンとリゾホスファチジルエタノールアミンは、それぞれを単離しても、又は場合により、両者の混合物として分離することもできる。

【0021】

【発明の効果】本発明の方法により、溶血作用等の種々

5

の生理活性作用を有し、又、血小板活性化因子の合成重要中間体になりうるリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンをそれぞれ提供することが出来る。

【0022】

【実施例】次に実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。なお、培地におけるパーセントは特に断りのない限り重量/容量%を示す。

【0023】実施例1

Mer-WF8035株 (FERM P-12311) の斜面寒天培養 (ポテト デキストロース寒天培地) から1白金耳を100mlの種培地 (馬鈴薯デンプン 2%, グルコース1%, 大豆粉2%, リン酸1カリウム 0.1%, 硫酸マグネシウム0.05%, pH無調整) を入れた500ml容三角フラスコに接種し、28℃で3日間振盪培養して種培養液を得た。この種培養液100mlを上記と同じ組成の培地5Lを含む10L容ジャーファーマンター (2基) に接種した。培養は、28℃で、88時間通気攪拌培養 (通気量: 5L/分、攪拌: 300rpm) を行った。

【0024】培養終了後、約10Lの培養液を濾過し、菌体固形分を得た。この菌体にメタノール10Lを加え、室温で攪拌機を用いて4時間攪拌して脂質の抽出を行った。菌体のメタノール抽出液は、減圧下で濃縮してメタノールを留去した後、得られた水溶液約400mlをブタノール400mlで2回抽出して、リゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルエタノールアミンをブタノール層に抽出した。

【0025】ブタノール抽出液800mlを減圧下で濃縮して約80mlとし、あらかじめメタノールで充填したセファデックスLH-20 (ファルマシア社製) カラム (4.5cm径×45cm) に40mlずつ2回に分けて付し、それぞれをメタノールで展開した。溶出液を10mlずつ分取し、各フラクションの溶血反応によりリゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミンを含む分画を検出した。その結果、フラクシ

6

ョン20-26にリゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミンの溶出を確認し、これらのフラクションを集め、減圧下に濃縮乾固した。

【0026】つぎに、乾固物をクロロホルム:メタノール混液 (1:2) 5mlに溶かし、予め同一混合溶液クロロホルム:メタノール (1:2) で充填したシリカゲル (ワコーゲルC-200、和光純薬工業社製) カラム (2.0cm径×40cm) に付し、同溶液で溶出を行った。10gずつ分画しフラクション9-14にリゾホスファチジルエタノールアミンをフラクション15-23にリゾホスファチジルコリンが溶出された。検出は先の溶血反応とシリカゲル薄層クロマトグラフ (メルク社製; Art. 5715、展開溶媒: クロロホルム:メタノール=1:1) で行った。リゾホスファチジルエタノールアミンとリゾホスファチジルコリンの各溶出区分を集め、減圧下に濃縮乾固して再びセファデックスLH-20カラムにかけた。リゾホスファチジルエタノールアミンの場合は、乾固物をクロロホルム:メタノール混液 (1:2) で充填したセファデックスLH-20カラム (1.1cm径×90cm) に付し、同混液で展開した。リゾホスファチジルコリンの場合は乾固物をメタノールで充填したセファデックスLH-20カラム (1.1cm径×90cm) に付し、メタノールで展開した。各溶出フラクションはシリカゲルTLC分析により検出を行い、それぞれの溶出フラクションを集め、減圧下に濃縮、乾固してリゾホスファチジルエタノールアミン150mg、リゾホスファチジルコリン166mgをそれぞれ得た。

【0027】かくして得られたリノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルコリンのNMR、FAB-MSデータは、Biochemistry, 26, 2797(1987)に記載のデータと一致した。又、リノール酸を唯一の構成脂肪酸とするリゾホスファチジルエタノールアミンは、機器分析 (NMR、FAB-MS) による構造解析から同定した [D. Dessort et al, Anal. Biochem., 142(1), 43(1984)]。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵
C12R 1:645)

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 渡辺 吉雄
神奈川県藤沢市藤が岡2-22-3
(72)発明者 吉岡 武男
神奈川県綾瀬市上土棚1959 グリーンハイ
ツ3-3102

(72)発明者 熊本 俊彦
神奈川県藤沢市鶴沼桜が岡1-9-12
(72)発明者 西田 浩史
神奈川県横須賀市津久井568 グリーンハ
イツ11-3-503
(72)発明者 岡本 六郎
神奈川県藤沢市花の木2-18

